体外診断用医薬品

製造販売承認番号
22600AMX01284000

この添付文書をよく読んでから使用してください。

マイコバクテリウム核酸キット

結核菌群 rRNA 検出試薬 TRCReady® MTB

[全般的な注意]

1. 本キットは自動遺伝子検査装置 TRCReady®-80（品番 0023950，以下 TRCReady®-80）の専用試薬です。
2. 本キットは体外診断用医薬品ですので，それ以外の目的には使用しないでください。
3. 臨床診断は他の関連する検査結果や臨床症状などに基づいて総合的に判断してください。本キットで陰性と判定された場合であっても結核感染を完全に否定できるものではありません。
4. 添付文書以外の使用方法については，測定結果の信頼性を保証いたしません。
5. 本キットにはヒト由来成分は含まれていませんが，検体やサンプル及びそれらが接触した容器などは感染性があるものとして取扱ってください。
6. 使用する機器の添付文書及び取扱説明書をよく読んでから使用してください。

[形状・構造等（キットの構成）]

1. ㊦ 反応試薬
   （1 本あたりグアノシン三りん酸 35 μg，イノシン三りん酸 52 μg を含有）
   (1) デオキシヌクレオシド三りん酸（dNTP）
   (2) ヌクレオシド三りん酸（NTP：グアノシン三りん酸を含有）
   (3) イノシン三りん酸（ITP）
   (4) 結核菌群 rRNA 切断用プローブ MTB-S-1
   (5) 結核菌群 rRNA プロモータープライマー MTB-F-1
   (6) 結核菌群 rRNA アンチセンスプライマー MTB-R-1
   (7) 蛍光標識結核菌群 rRNA 検出用プローブ MTB-P-1
   (8) 逆転写酵素
   (9) RNA ポリメラーゼ
2. 開始液
3. 陽性コントロール
4. 陰性コントロール

[使用目的]

体液，組織，気管支洗浄液，又はそれらの培養液中の結核菌群 rRNA の検出（結核診断の補助）

[測定原理]

1. 測定原理

本キットは，インターカレーター性蛍光色素が標識された DNA プローブと一定温度 RNA 増幅法を組み合わせて，RNA を 1 ステップで増幅・リアルタイム検出する TRC（Transcription Reverse-transcription Concerted reaction）法[1,2]を原理とした核酸増幅検査キットです。本キット中に含まれる結核菌群 rRNA 切断用プローブ，結核菌群 rRNA プロモータープライマー，及び結核菌群 rRNA アンチセンスプライマーが結核菌群 rRNA に結合すると，酵素（逆転写酵素，RNA ポリメラーゼ）が基質類（dNTP, NTP, ITP）を用いて転写，逆転写反応などを行い，RNA が増幅合成されます。この RNA 増幅反応と並行して，蛍光標識結核菌群 rRNA 検出用プローブが増幅合成された RNA と結合し，蛍光強度が増加するため，反応液中の蛍光強度が経時的に計測されることにより，サンプル中の結核菌群 rRNA が検出されます。

2. 特徴

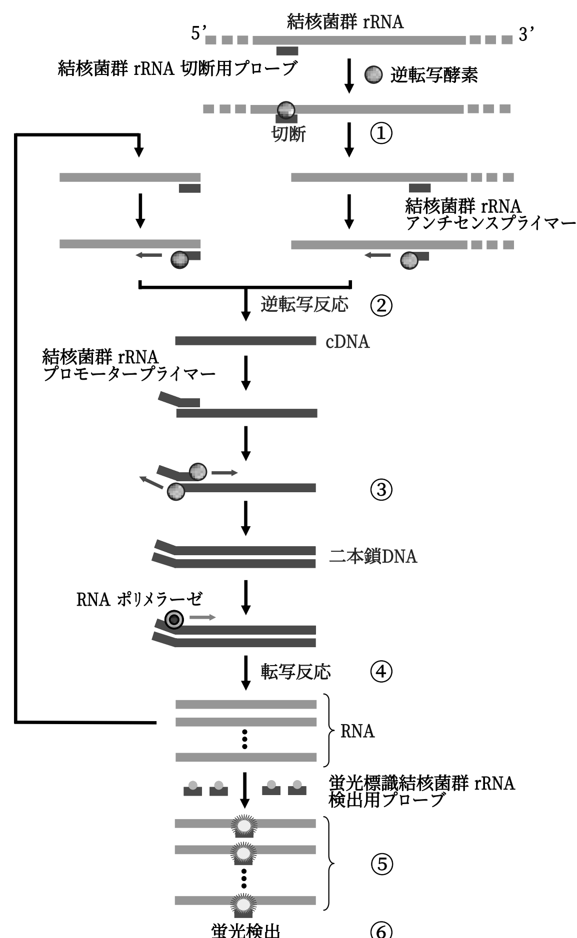
本キットは核酸増幅検査法の特徴である迅速性を有しています。本キットの反応試薬，及び開始液は 1 回測定分が個別に封入された形態となっており，測定時の試薬調製が不要です。さらに，反応は 1 本の密閉チューブ内で完了するため，コンタミネーションやキャリーオーバーの危険性がほとんどありません。また，専用機器を用いて測定操作を自動で行うことが可能です。なお，本キットでは試薬中の内部コントロールによりサンプルに由来する反応阻害を検知することができ，偽陰性を防ぐことができます。

[操作上の注意]

1. 測定試料の性質，採取法

(1) 本キットでは核酸抽出されたものを測定用サンプルとして使用し，それ以外は使用しないでください。
(2) 検体の前処理から測定まで速やかに実施してください。

（測定原理図）



① 結核菌群 rRNA 切断用プローブと逆転写酵素の RNase H活性により結核菌群 rRNA の 5’側が切断される。
② 結核菌群 rRNA アンチセンスプライマーと逆転写酵素の逆転写活性により，結核菌群 rRNA に相補的な cDNA が合成される。
③ 結核菌群 rRNA プロモータープライマーと逆転写酵素の DNA polymerase 活性により二本鎖 DNA が合成される。
④ RNA ポリメラーゼにより RNA が増幅合成される。（増幅された RNA の一部は②の逆転写反応の鋳型となる）
⑤ 増幅されたRNA に蛍光標識結核菌群 rRNA 検出用プローブが結合して蛍光強度が増加する。
⑥ 増加した蛍光強度を経時的に計測する。

(3) 保存が不適当な検体や凍結融解した検体は，RNA の損失により検出されないことがあります。
(4) 唾液成分が多い喀痰検体は，採痰指導などを行い，良質な喀痰を得るようにしてください[3]。
(5) クロスコンタミネーションを防ぐために，エアロゾルの発生や手袋の汚染に十分注意し，ピペットチップなどは検体ごとに新しいものに交換してください。
(6) 検体の前処理では感染の危険性がありますので，手袋やマスクなどの保護具を着用して，必ず安全キャビネット内で操作してください。

2. 検体の前処理法

本キットで測定する検体の前処理には，喀痰の場合はセミアルカリプロテアーゼ処理での均質化を行った後，米国の CDC が推奨している NALC-NaOH 法で処理することを推奨します。他の方法で処理された場合は，十分な性能を得られない場合があります。セミアルカリプロテアーゼ処理後の NALC-NaOH 法による処理方法は以下の通りです。

(1) 15 mL 又は 50 mL 遠心管に約 1 mL の均質化した検体を分注します。
(2) 検体の 2 倍量の 2 %NALC-NaOH [注 1] を加えます。
(3) 混和後，5～25 ℃で 15 分間放置します。
(4) 0.067 mol/L りん酸緩衝液（pH6.8）を遠心管いっぱいまで加えます。
(5) 転倒混和後，4 ℃ 3,000×g で 20 分間遠心分離します。
(6) 上清を除去して，0.067 mol/L りん酸緩衝液(pH6.8)を 1 mL 添加して混和します。
(7) 測定用サンプルの調製（試料の核酸抽出）を行います。

[注 1] 2 %NALC-NaOH：4 %NaOH と 0.1 mol/L クエン酸ナトリウムを 50 mL ず

つ混合し, *N*-acetyl-L-cysteine 0.5 g を加えた溶液

3. 測定用サンプルの調製法 (試料の核酸抽出)

本キットの測定用サンプル調製法としては, 別売の TRCR^{R}抗酸菌溶菌試薬 (品番 0056202) [注 1] による溶菌, 並びに TRCR^{R}核酸精製キット (品番 0056201) 及び TRCReady^{R}-80 による核酸精製を組み合わせた核酸抽出方法を推奨します。他のサンプル調製法を用いる場合は, 用法用量に従うとともに, 核酸を損失しないよう十分に注意してください。サンプル調製法の詳細については, 各製品の取扱説明書を参照してください。

全ての操作は手袋を着用して行い, また以下の (1)～(5) の操作は感染の危険性がありますので, マスクなどを着用の上, 安全キャビネット内で操作してください。

<u>TRCR^{R}抗酸菌溶菌試薬による溶菌</u>

(1) 1.5 mL スクリューキャップ付きチューブに抗酸菌溶菌試薬 200 µL を分注します。
(2) 前処理済みの体液, 組織, 気管支洗浄液 200 µL, あるいは培養液 2-10 µL [注 2] を加え, 撹拌します。
(3) 80 ℃で 10 分間加温します。
(4) 得られたサンプル (以下, 溶菌サンプル) は TRCR^{R}核酸精製キットにより核酸精製してください。

<u>TRCR^{R}核酸精製キットによる核酸精製</u>

(5) TRCR^{R}核酸精製キット及び TRCReady^{R}-80 の取扱説明書に従い, (4)で得られた溶菌サンプルの精製を実施します [注 3]。

[注 1] 別売の抗酸菌核酸抽出試薬 EXTRAGEN MB (品番 0054001) の溶菌試薬とは異なりますのでご注意ください。
[注 2] 菌の増殖が確認された時点での培養液を使用してください。
[注 3] TRCReady^{R}-80 では TRCR^{R}核酸精製キットによる核酸精製と, それに引き続く測定が連続して実施されます。

4. 妨害物質・妨害薬剤

下表の物質・薬剤を NALC-NaOH 処理後の喀痰を模した検体に表中の濃度になるように添加し, それらの核酸抽出物を本キットで評価したところ, 本キットの測定への影響は認められませんでした。

物質名	濃度
ヘモグロビン	85.0 mg/mL
ムチン	3.0 mg/mL
DNA	0.15 mg/mL
脂肪 (精製ダイズ油)	10 mg/mL
唾液	10 %
ヘパリンナトリウム	0.300 mg/mL
EDTA 二カリウム	7.50 mg/mL
クエン酸ナトリウム	16.7 mg/mL

薬剤名	濃度
イソニアジド	40.0 µg/mL
エタンブトール	28.5 µg/mL
リファンピシン	40.0 µg/mL
ピラジナミド	175 µg/mL
カナマイシン	237 µg/mL
ストレプトマイシン	200 µg/mL
クラリスロマイシン	11.2 µg/mL

5. 交差反応性

非結核性抗酸菌 18 種 (*M. avium, M. intracellulare, M. kansasii, M. abscessus, M. chelonae, M. fortuitum, M. gastri, M. gordonae, M. marinum, M. nonchromogenicum, M. peregrinum, M. scrofulaceum, M. simiae, M. szulgai, M. terrae, M. triviale, M. xenopi, M. shinjukuense*) の rRNA (10^6 分子相当/テスト) について測定を行ったところ, 交差反応は認められませんでした。

6. その他

(1) 本キットは TRCReady^{R}-80 の専用試薬です。
(2) サンプル中に核酸増幅の妨害物質や多量の標的以外の核酸が存在すると, 正しい結果が得られない場合があります。
(3) 本キットを使用する際には微生物や核酸分解酵素のコンタミネーションを避けてください。汗や唾液に含まれる RNase が少量でも検体に混入すると, RNA が分解されて測定結果に誤りが生じる可能性があります。操作中の RNase 混入を防ぐため, 本キットの操作は手袋及びマスクを着用して実施してください。

[用法・用量 (操作方法)]

1. 試薬の調製方法

本キットのすべての構成試薬はそのまま使用してください。

(1) 反応試薬:1 テストあたり 1 本使用します。アルミ袋を開封し, 測定に必要な本数を取り出したのち, 残りの試薬は直ちに元のアルミ袋で密封し 2～8 ℃で保存してください。一度アルミ袋を開封した反応試薬は 30 日以内に使用してください。なお, 反応試薬は乾燥品であり, 透明または白色でチューブ底に保持されています。
(2) 開始液:1 テストあたり 1 本使用します。
(3) 陽性コントロール:スピンダウンしてから使用してください。陽性コントロールは 1 本あたり 4 回まで使用可能です。測定終了後は速やかに 2～8 ℃で保存してください。
(4) 陰性コントロール:スピンダウンしてから使用してください。陰性コントロールは 1 本あたり 4 回まで使用可能です。測定終了後は速やかに 2～8 ℃で保存してください。検体と同時に測定してください。

2. 必要な器具・器材

(1) TRCReady^{R}-80 及びその付属品, 取扱説明書 (以下, 機器の取扱説明書)
(2) TRCR^{R}検出試薬用チップセット (品番 0056301)
(3) 手袋
パウダーフリーのものを使用してください。
(4) マスク

TRCR^{R}核酸精製キットによる核酸抽出物以外を測定用サンプルとして用いる場合には以下 (5) ～(8) をご準備ください。

(5) 0.5 mL スクリューキャップチューブ
DNase 及び RNase フリーの以下のチューブをご使用ください。
0.5 mL Screw Cap Tube, Scientific Specialties Inc., No.2120-00
(6) スクリューキャップ
(5)記載のチューブに合うものをご使用ください。
(例 : Standard Screw Cap with O-ring, Scientific Specialties Inc., No.2001-00)
(7) ピペッター
測定用サンプルの液量が分注可能なものをご使用ください。
(8) 分注チップ
DNase 及び RNase フリーでかつ, エアロゾル防止が施されたチップ (フィルター付など) をご使用ください。

3. 測定 (操作) 法

本キットは TRCReady^{R}-80 を用いて測定してください。TRCReady^{R}-80 の操作方法の詳細は機器の取扱説明書に従って行ってください。

(1) TRCReady^{R}-80 本体のスイッチを入れます。
(2) コントローラー (PC) のアプリケーションを起動させます。
(3) 割り当てられたユーザー名でログオンします。
(4) 測定依頼 (測定モード, サンプル ID, 種別, 検査項目など) の入力を行います。検査項目は「MTB」を選択してください。
(5) 反応試薬, 開始液, 及び TRCR^{R}検出試薬用チップセットを検出用ラックにセットします。
(6) 検出用ラックを TRCReady^{R}-80 にセットします。
(7) 測定する陽性コントロール及び陰性コントロールをキャップを外した状態で精製用ラックの所定の位置にセットします。
(8) 測定用サンプルを 0.5 mL スクリューキャップチューブに 15 µL＋デッドボリューム分 [注 1] 分注し, キャップを外した状態で精製用ラックにセットします [注 2]。
(9) 精製用ラックを TRCReady^{R}-80 にセットします。
(10) 機器の取扱説明書に従って測定をスタートさせます。

TRCReady^{R}-80 により, 以下の (11)～(14) の操作が実行されます [注 3]。

(11) 反応試薬に陽性コントロール, 陰性コントロール, 又は測定用サンプルが添加され, 所定温度でインキュベーションされます。
(12) (11) の溶液に開始液が添加され, 混合されます。
(13) 所定時間, 所定温度でインキュベーションされながら, 蛍光強度が経時的に測定されます。
(14) 測定された蛍光強度をもとに解析が行われ, 測定結果画面に判定結果が表示されます。

[注 1] サンプルのデッドボリュームについては機器の取扱説明書に従ってください。
[注 2] TRCR^{R}核酸精製キットによる核酸精製と本キットによる測定を連続して行うサンプルについては TRCR^{R}核酸精製キット及び機器の取扱説明書に従ってください。
[注 3] TRCR^{R}核酸精製キットによる核酸精製と本キットによる測定を連続して行う場合には, TRCR^{R}核酸精製キット内の回収チューブに測定用サンプル (精製サンプル) が回収されたのち, (11)～(14) の操作が実行

されます。

[測定結果の判定法]

1. 判定方法

TRCReady®-80 では測定結果が自動的に判定され，測定結果画面上に表示されます。サンプルの判定結果は判定欄に次のように表示されます。

サンプルの判定結果

結果	結果表示
陽性	MTB
陰性	—
判定保留［注 1］	F

［注 1］測定フラグ欄に測定フラグがない場合には，サンプルに由来する反応阻害の可能性があります。再核酸抽出又は新たに採取した検体を用いて測定することを推奨します。測定フラグがある場合には，機器の取扱説明書を参照してください。

なお，陽性コントロール及び陰性コントロールを測定した際，測定が正しく行われた場合は「Valid」と表示されます。「Invalid#1」が表示された場合には機器の取扱説明書を参照ください。「Invalid#2」が表示された場合には機器の取扱説明書を参照するとともに，同時に測定したサンプルの再測定を実施してください。

サンプル，陽性コントロール及び陰性コントロールを測定した際，上記以外の結果が表示された場合は機器の取扱説明書を参照ください。

2. 判定上の注意

(1) 結核の臨床診断は，他の検査成績や臨床症状などを考慮して総合的に判断してください。
(2) 菌量が微量な検体，保存が不適当な検体，又は核酸抽出が不適当なサンプル（例えば，抽出操作中に核酸が消失したサンプル）を測定した場合は，陰性となることがあります。
(3) サンプル中に標的以外の核酸が多量に存在すると正しい判定結果が得られないことがあります。
(4) 本キットのプライマー及びプローブは標的配列中の保存性が高い領域に設計されていますが，測定する遺伝子の変異や欠損/挿入などにより正しい判定結果が得られない場合があります。
(5) 本キットで陰性と判定されても必ずしも結核菌群の存在を否定するものではありません。

[性能]

1. 性能

1-1. 性能

(1) 感度

管理用試料 1［注 1］を測定したとき，陽性と判定されます。

(2) 正確性

1) 陰性管理用試料［注 2］を測定したとき，陰性と判定されます。
2) 管理用試料 2［注 3］を測定したとき，陽性と判定されます。

(3) 同時再現性

1) 陰性管理用試料［注 2］を 3 回同時に測定したとき，すべて陰性と判定されます。
2) 管理用試料 2［注 3］を 3 回同時に測定したとき，すべて陽性と判定されます。

［注 1］標準 RNA 300 分子相当/テストを含む試料
［注 2］結核菌群 rRNA を含まない試料
［注 3］標準 RNA 10^3 分子相当/テストを含む試料

1-2. 最小検出感度

標準 RNA 300 分子相当/テスト

2. 相関性試験成績

臨床検体を用いて本キットと既承認品（TRC 法キットとリアルタイム PCR 法キット）との比較検討を実施しました。既承認 TRC 法キットとの相関性試験は，体液 171 検体（喀痰 109，胸水 25，胃液 17，血液 5，尿 5，腹水 3，耳漏 3，リンパ穿刺液 2，糞便 2），組織 8 検体，気管支洗浄液 16 検体，培養液 30 検体で実施し，全体一致率は 99.1％（223/225）でした。

既承認リアルタイム PCR 法キットとの相関性試験は，体液 168 検体（喀痰 109，胸水 25，胃液 17，血液 2，尿 5，腹水 3，耳漏 3，リンパ穿刺液 2，糞便 2），組織 8 検体，気管支洗浄液 16 検体，培養液 30 検体で実施し，全体一致率は 96.8％（215/222）でした。

		既承認品（TRC 法）		全体一致率
		陽性	陰性	
本キット	陽性	82	1［注 1］	99.1％ (223/225)
	陰性	1［注 2］	141	

		既承認品（リアルタイム PCR 法）		全体一致率
		陽性	陰性	
本キット	陽性	77	5［注 3］	96.8％ (215/222)
	陰性	2［注 4］	138	

［注 1］乖離検体は塗抹検査陰性で培養検査陽性でした。
［注 2］乖離検体は塗抹検査陰性で培養検査陽性でした。
［注 3］乖離検体 5 検体のうち，4 検体は塗抹検査陰性で培養検査陽性，1 検体は培養検査陽性でした。
［注 4］乖離検体は塗抹検査陰性で培養検査陽性でした。

3. 較正用基準物質

結核菌群 rRNA をコードする DNA をもとに合成，精製された RNA。

[使用上又は取扱い上の注意]

1. 取扱い上（危険防止）の注意

(1) 検体，前処理済み検体，及び本キットのサンプルは MAC，結核菌，及びその他の抗酸菌，又は，HIV，HBV，HCV などの感染の恐れがあるものとして取扱ってください。
(2) 本キットの使用時は保護眼鏡，使い捨て手袋，作業着を着用し，測定終了後はよく手を洗ってください。また，口によるピペッティングを行わないでください。
(3) 試薬が皮膚・目・粘膜に触れないように注意し，もし，このようなことが起きた場合は直ちに水で十分に洗い流してください。こぼれた場合には水で希釈してから拭き取ってください。
(4) 反応試薬及び開始液のアルミシール，並びにアルミ袋の角部分あるいは切断面に触れると切創する場合がありますので，取扱いに注意してください。

2. 使用上の注意

(1) 本キットは，貯法に従い保存してください。凍結させたり，長時間室温に放置させたりしないでください。また，貯法以外の条件で保存した試薬は使用しないでください。
(2) 使用期限を過ぎた試薬は使用しないでください。
(3) 反応試薬は，チューブの底にゴミが付着していないことを確認してから装置にセットしてください。チューブの底にゴミが付着していると蛍光値に異常が見られる場合があります。
(4) 反応試薬のチューブには落下などによる衝撃を与えないでください。
(5) 開始液は，シール部分やチューブ上部に試薬又は水滴の付着が見られた場合，手で軽く振って落としてください。また，試薬に気泡が入っている場合は，スピンダウンして除いてください。試薬が上部に付着している場合や気泡が入っている場合，正しく測定できないことがあります。
(6) 本キット内の試薬は正確な反応が得られるように組み合わせてありますので，キット内の試薬の組み合わせのみで使用し，製造番号が異なるキットの試薬を組み合わせて使用しないでください。また同一の製造番号のキットであっても試薬を注ぎ足すことは行わないでください。
(7) 反応試薬，開始液のチューブ，及びアルミシールには何も記入しないでください。また，アルミシール表面をこすったり傷つけたり汚したりしないでください。正しく測定できない場合や装置での読み取りができない場合があります。

3. 廃棄上の注意

(1) 本キットによる試験で使用した検体，試料，サンプル，及びそれらが接触した容器は感染性のあるものとして，各施設のバイオハザード取扱規定を遵守して取扱ってください。
(2) 測定終了後の反応液を廃棄する場合は，チューブの蓋をしたままで，蓋のできる別の容器に入れて密封し，各施設のバイオハザード取扱規定を遵守して廃棄してください。
(3) 測定終了後の開始液，チップなどはサンプルと接触したものとして扱い，クロスコンタミネーションに注意するとともに，各施設のバイオハザード取扱規定を遵守して廃棄してください。
(4) 試薬及び器具などを廃棄する場合には，廃棄物の処理及び清掃に関する法律，水質汚濁防止法などの規定に従って処理してください。

[貯蔵方法, 有効期間]
1. 貯蔵方法　2～8 ℃で保存してください。
2. 有効期間　12ヶ月。 使用期限は箱ラベルに記載されています。

[包装単位]
品 番　0056101
品 名　結核菌群 rRNA 検出試薬 TRCReady[R] MTB
包 装　24 テスト

構成試薬名	包装内容
反応試薬 (橙)	24 本 (8 本/袋×3 袋)
開始液 (白)	50 µL×24 本
陽性コントロール (赤)	100 µL×3 本
陰性コントロール (青)	100 µL×3 本

[主要文献]

1. Ishiguro T. *et al.*, Intercalation activating fluorescence DNA probe and its application to homogeneous quantification of a target sequence by isothermal sequence amplification in a closed vessel., Analytical Biochemistry, 314, 77-86, 2003.
2. 保川清, TRC 反応による RNA の増幅とリアルタイム検出, 医学のあゆみ, 206(8), 479-483, 2003.
3. 結核菌検査指針 2007, 財団法人結核予防会, 2007.

[問い合わせ先]
東ソー株式会社 バイオサイエンス事業部
カスタマーサポートセンター
〒252-1123 神奈川県綾瀬市早川 2743-1
フリーダイアル (0120) 17-1200
TEL (0467) 76-5384
FAX (0467) 79-2550

[製造販売業者の氏名又は名称及び住所]
東ソー株式会社
〒105-8623 東京都港区芝 3-8-2
TEL (03) 5427-5181

東ソー株式会社
TOSOH